DETEKCIJA VIRUSA INFEKTIVNE DEGENERACIJE VINOVE LOZE

Đina Konstantin, Goran Barać, Renata Iličić, Ferenc Bagi

Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

E-mail: djinakonstantin@gmail.com

Izvod

Fitopatogeni virusi uzrokuju značajne ekonomske gubitke i predstavljaju pretnju za održivu poljoprivredu. Zbog višestruke mogućnosti širenja virusi su postali široko rasprostranjeni u svim vinogradarskim područjima kod nas. Rano otkrivanje biljnih virusa i upotreba zdravog sadnog materijala je osnovna mera efikasne kontrole. Na vinovoj lozi opisan je veliki broj biljnih virusa, koji zbog sličnosti u simptomima koje prouzrokuju zahtevaju primenu odgovarajućih laboratorijskih metoda detekcije i identifikacije. Zbog široke rasprostranjenosti virusa infektivne degeneracije vinove loze - GFLV u ovom radu dat je pregled metoda koje se koriste u cilju ranog otkrivanja i sprečavanja širenja ovog virusa. Razrade tehnika detekcije koje omogućavaju bržu kontrolu sadnog materijala vinove loze, imaju za cilj stvaranje i stavljanje u promet zdravog sadnog materijala u našoj zemlji.

Ključne reči: GFLV, sadni materijal, detekcija, serološke, molekularne metode

UVOD

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) je vrsta velike agronomске važnosti, najviše sa aspekta proizvodnje vina. Patogeni koji parazitiraju na vinovoj lozi, smanjuju pri-nose i čine veliku štetu vinskoj industriji. Sadnice vinove loze zaražene virusima daju znatno lošiju sirovinu za proizvodnju vina i skraćuju životni vek vinograda. Produktivni vek vinograda usled infekcije virusom infektivne degeneracije vinove loze (*Grapevine fanleaf virus* - GFLV) iznosi 15-20 godina umesto 30-40 ili više. Kvalitet grožđa je smanjen zbog niže koncentracije šećera i povećane ukupne kise-losti, a ekonomski gubici iznose čak i do 80% (Andret-Link i sar., 2005), odnosno 100% (Raski i sar., 1983; Diklić, 2014). Prema EPPO (2018) sertifikacionoj šemi i Pravilniku o zdravstvenom pregledu useva i objekata za proizvodnju semena, rasa-

da i sadnog materijala i zdravstvenom pregledu semena, rasada i sadnog materijala ("Sl. glasnik RS" 2008), sertifikovan sadni materijal vinove loze mora biti slobodan od svih virusa. Najčešće prisutni i ekonomski najznačajniji virusi na vinovoj lozi su: *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) i *Grapevine fleck virus* (GFkV) (EPPO, 2008).

Veliki problem u poljoprivrednoj proizvodnji predstavlja suzbijanje virusnih zaraza i sprečavanje njihove pojave. Naime, jedan od glavnih razloga je što hemijske mere koje su delotvorne kod drugih prouzrokovaca biljnih bolesti nisu efikasne u suzbijanju virusnih zaraza. Jednom zaražene biljke ostaju trajno zaražene. Stoga, najznačajniji vid borbe protiv fitopatogenih virusa jeste proizvodnja zdravog, bezvirusnog sadnog materijala. U stvaranju zdravog biljnog materijala koriste se metode kao što su hemoterapija, termoterapija i kultura meristema. Iako su navedene mere pokazale pozitivan efekat u proizvodnji zdravog bezvirusnog biljnog materijala, neophodno je pribеći merama ispitivanja sadnog i setvenog materijala na ekonomski značajne viruse i pre podizanja zasada (Bagi i sar., 2016). Osnovna mera prevencije širenja virusnih bolesti je zasnivanje vinograda sa potpuno zdravim biljkama. U postupku proizvodnje sertifikovanog sadnog materijala se koriste različite metode identifikacije i detekcije virusa: morfološka i fenotipska analiza, enzimski imunotest ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), metoda reverzne transkripcije i lančane reakcije polimeraze (RT-PCR, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) i *quantitative PCR* (RT-*qPCR*). Nedostatak morfološke analize je što virusi ponekad ne izazivaju vidljive simptome (Martelli, 2014) ili različiti virusi mogu uzrokovati slične promene. U cilju precizne identifikacije virusa primenjuju se osetljive i precizne metode, kao što je ELISA test, RT-PCR, qRT-PCR *quantitative PCR* (Mekuria i sar., 2003).

VIRUS INFEKTIVNE DEGENERACIJE VINOVE LOZE (GFLV)

Virus infektivne degeneracije vinove loze (GFLV) jedan je od najznačajnijih virusnih bolesti vinove loze širom sveta. Takođe je jedan od najstarije poznatih virusnih bolesti *V. vinifera* sa opisima simptoma, koji su prijavljeni u Evropi još 1841. godine (Fuchs i sar., 2009). GFLV pripada redu *Picornavirales*, familiji *Secoviridae*, rodu *Nepovirus*. Virus je izometrijskog oblika sa tri tipa čestica (T, M i B). Sve čestice imaju prečnik oko 30 nm (Martelli et al., 2001). Genom je dvodelna ss (+) RNK. Proteinski omotač je sagrađen od jedne vrste proteina, sastavljen od 60 proteinskih podjedinica (triangulacioni broj T=1). Domaćin virusa je vinova loza, a veštačkim inokulacijama se može preneti na eksperimentalne domaćine (Bagi i sar., 2016). Virus se raširio u sve regione gajenja vinove loze putem zaraženog sad-

nog materijala. Prenosi se i kalemljenjem. Za lokalno širenje virusa odgovorna je pre svega nematoda *Xiphinema index*, a kao povremeni vektor se navodi i *X. italiae* (Cohn et al., 1970). Prema Lázár et al. (1990) virus se prenosi semenom vinove loze, te sejanci mogu biti zaraženi. Simptomi obuhvataju morfološke i hromatske promene (Maliogka et al., 2015). Virus je dobio ime po promenama na liskama zaražene vinove loze, koje gube karakterističan oblik za datu sortu, pa nastaju promene u obliku koje se kreću od peršunavosti do lepezavosti listova, odnosno potpunog nestajanja režnjeva. Na listovima se mogu obrazovati i enacije. Usled hipoplazije dolazi do skraćivanja internodija na lastarima vinove loze, što prouzrokuje približavanje kolenaca i njihovo spajanje (dvojna kolenca). Lastari često imaju nepravilan „cik-cak“ porast. Može doći i do abnormalnog grananja i pljosnatog oblika preseka stabla. Usled zaraze nastaje i posebna patološka tvorevine u tkivu ksilema, „endovaskularni kordon“, koji predstavlja zdrvenjenu traku tkiva u sudovima. Formira se manji broj grozdova koji su rehuljavi, sa proređenim sitnim bobicama. Bobice neravnomerno sazrevaju. Sadržaj šećera u bobicama je umanjen. Hromatske promene se najčešće karakterišu žutim mozaikom ili žućenjem listova, koje je izražene tokom proleća, nego u kasnijem delu vegetacije. Kod zaraženih čokota koren je slabije razvijen i sa manjim brojem žilica. Gubici u prinosu zavise od sorte, soja virusa i ekoloških činilaca i mogu biti umereni (5-10%) do veoma visoki (preko 90%). Virus smanjuje uspešnost srastanja podloge i plemke, kao i ukorenjivanje sadnica (Martelli et al., 2001). Usled prenošenja nematodama, zaražene biljke se u vinogradu često javljaju u oazama koje se postepeno povećavaju. Međunarodni savet za proučavanje viroza i virozama sličnih oboljenja (ICVG - International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine) formiran je 1962. sa ciljem proučavanja prirode virusnih oboljenja i pružanja savetodavnih usluga o mogućim merama za umanjene šteta u vinogradarskoj proizvodnji (Maliogka et al., 2015). Fitosanitarne mere, kao što je krčenje zaraženih čokota zajedno sa korenom, sprečavanje prenošenja zemljišta sa parcele na parcelu, suzbijanje vektora-nematoda, plodored i druge mere smanjuju dinamiku širenja oboljenja i obim šteta (Dalmasso et al., 1972; McKenry i Thomason, 1974; Almeida et al., 2013). Komar et al. (2008) preporučuju unakrsnu zaštitu, odnosno inokulaciju biljaka sa blagim sojevima virusa kao meru za umanjene šteta. Usled neuspeha u pronalaženju gena otpornosti unutar roda *Vitis* i dugog procesa tradicionalnog oplemenjivanja svetska istraživanja su usmerena ka biotehnološkim metodama oplemenjivanja i stvaranja transgene otpornosti prema virusima (Fuchs, 2003; Sastry i Zitter, 2014). Istovremeno, usavršavaju se tehnike detekcije koje omogućavaju bržu kontrolu sadnog materijala vinove loze na ovaj i druge viruse i veću sigurnost u prometu zdravog sadnog materijala (Čepin et al., 2010; Martelli, 2014).

DETEKCIJA VIRUSA INFEKTIVNE DEGENERACIJE VINOVE LOZE

U cilju uspešne i pouzdane detekcije GFLV, za preporuku je primena laboratorijskih metoda koje se zasnivaju na detekciji proteina virusnih čestica – ELISA test ili nukleinskih kiselina – RT-PCR i qRT-PCR. Primena ovih metoda posebno je značajna u slučaju latentnih infekcija vinove loze, kada ne nastupa pojava simptoma bolesti. Kako se radi o virusnim oboljenjima, tačnu dijagnozu nije moguće odrediti na osnovu simptoma, već samo korišćenjem adekvatnih seroloških ili molekularnih laboratorijskih metoda (Weber i sar., 2020).

Serološka testiranja – ELISA test u detekciji GFLV

Enzimski imunoadsorbcioni test (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) je prvi put opisana 1971 od strane Engvall i Perlmann (1971) i Van Weemen i Schuurs (1971). Nakon inicijalnog opisivanja brojni naučnici koriste ovu metodu, prilagođavaju je specifičnim potrebama čime se stvaraju brojne varijacije (Aydin, 2015). Svaka ELISA metoda zasniva se na hemijskoj interakciji između antigena i antitela. Dvostruki sendvič antitela ELISA (Double antibody sandwich- ELISA, DAS-ELISA) je najčešće korišćena metoda za detekciju virusa u biljnim tkivima (Clark i Adams, 1977). Kod ove metode ciljani antigen biva zarobljen između dva antitela (nalazi se u sendviču) odakle naziv metoda vodi poreklo. Na samom početku površina bunarčića mikrotitar ploče se oblaže odgovarajućim antitelima (Anti-GFLV-IgG) nakon čega se dodaje uzorak i inkubira određeni vremenski period zavisno od proizvođača reagenata. Tokom inkubacije dolazi do reakcije između antigena i antitela i njihovog međusobnog vezivanja. Višak nevezanih antigena iz uzorka se odstranjuje ispiranjem mikrotitar ploče. U sledećem koraku dodaju se antitela koja su obeležena enzimom (Anti-GFLV-IgG-AP-conjugate). Mikrotitar ploča se ponovo inkubira i ispira, nakon čega se dodaje substrat, najčešće dietanolamin. U slučaju da je došlo do reakcije antigen-antitelo, dolazi do promene boje smeše usled reakcije između enzima (alkalna fosfataza) i p-nitrofenilfosfata (PNPP), a intenzitet obojenosti se određuje pomoću spektrofotometra (Aydin, 2015; Sakamoto i sar. 2018). Pojava žute boje ukazuje na prisustvo virusa, dok se na osnovu vrednosti očitavanja na spektrofotometru donosi konačan zaključak. Uzorak se smatra pozitivnim (zaraženim) ukoliko je očitana vrednost apsorpcije bar dva puta viša od očitane vrednosti negativne kontrole.

Molekularna testiranja - RT-PCR, qRT-PCR. u detekciji GFLV

Lančana reakcija polimeraze (Polymerase Chain Reaction, PCR) je laboratorijska tehnika koja predstavlja proces replikacije DNK *in vitro*. Kary B. Mullis je 1983

postavio teorijske osnove metode za umnožavanje DNK, a 1986 prvi put opisuje detalje i svaki od koraka PCR metode (Mullis i sar., 1986; Mullis i Faloona, 1987). Za ovo revolucionarno otkriće Dr. Mullis je 1993. godine dobio Nobelovu nagradu za hemiju. PCR metoda se koristi za umnožavanje ciljane sekvence DNK što se postiže primenom oligonukleotidnih prajmera koja se vezuju sa suprotne lance DNK molekula i na taj način ovičavaju region od interesa (Erich, 1989). Ključnu ulogu u umnožavanju DNK igra enzim DNK polimeraza koja koristi slobodne deoksinukleotide (dATP, dCTP, dTTP i dGTP) i formira novi lanac počevši od specifičnih prajmera (Garibyan i Avashia, 2013). Amplifikacija ciljanog fragmenta DNK se postiže kroz seriju cikličnih zagrevanja i hlađenja reakcione smeše: 1. zagrevanje reakcione smeše najčešće na 94-95°C čime se razdvajaju lanci DNK molekula (denaturacija); 2. hlađenje reakcione smeše (50-60°C) usled čega dolazi do vezivanja prajmera (aniling); 3. ponovno zagrevanje na 72°C kako bi DNK polimeraza (Taq polimeraza) sintetisala novi DNK lanac (ekstenzija) (Caetano-Anollés, 2013). PCR je tehnika koja se danas koristi u gotovo svim oblastima bioloških istraživanja, biotehnologiji, kliničkim istraživanjima, kliničkoj dijagnostici, forenzici, prehrambenoj tehnologiji, ispitivanjima životne sredine, arheologiji, antropologiji, ali i u dijagnostici fitopatogenih organizama (Wages, 2005). Za detekciju virusa putem PCR metode koriste se visokokonzervirani regioni viralnog genoma kako bi se sintetisali prajmeri koji su specifični za vrstu. Ukoliko se tokom detekcije pomoću prajmera specifičnih za vrstu, uspe inicirati stvaranje komplementarne replike datog regiona, tada se dokazuje da je ispitani organizam isti kao organizam na osnovu kog su sintetizovani prajmeri, odnosno vrši se pozitivna identifikacija (Bagi i sar., 2016). Rezultati PCR reakcije se vizualizuju putem elektroforeze, kada se umnoženi fragmentna agaroznom gelu pojavljuje kao jasna traka sa istom molekularnom masom kao ciljna sekvenca virusa. Većina biljnih virusa kao genetički materijal sadrži RNK te ja za uspešnu detekciju virusa neophodno prevesti RNK u DNK (tzv. reverzna transkripcija), i tek nakon toga raditi PCR te se metoda u ovom slučaju naziva „reverse transcription PCR“ (RT-PCR) (Alemu, 2015; Bagi i sar., 2016). Reverzna transkripcija je moguća zahvaljujući otkriću enzima reverzna transkriptaza, koja predstavlja RNK-zavisnu DNK polimerazu koja sintetiše DNK lanac na osnovu RNK matrice. Nakon uspešnog prevođenja RNK u cDNK sprovodi se PCR (Mekuria i sar., 2003).

Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (qRT-PCR) predstavlja modifikaciju standardne PCR metode koja se ogleda u tome što se u reakcionu smešu dodaju fluorescentno obeležene probe čija je sekvenca komplementarna ciljanom lokusu koji se nalazi između para prajmera. Proba na svom 5' kraju ima fluorescentnu boju koju nazivamo „reporter“ (reporter, R), a na svom 3' kraju „prigušivač“ (quencher, Q). Proba hibridizuje sa DNK i dokle god je nepromenjena prigušivač blokira reporter i nije moguće detektovati fluorescenciju. Tokom PCR reakcije DNK polimeraza koja ima 5'-egzonukleaznu aktivnost iseca probu čime se prigušivač odaljava od reportera i dolazi do fluorescencije koja se može detek-

tovat. Količina emitovanog fluorescentnog signala je u direktnoj proporciji sa količinom umnožene DNK (Holland i sar., 1991; Butler, 2012; Nestorov i sar., 2013). Ovim je omogućena kvantifikacija umnoženog DNK fragmenta, a samim tim moguće je odrediti i njegovu zastupljenost u uzorku što je čini pogodnom za rutinsku dijagnozu i detekciju patogena (Trujillo i sar., 2006; Bruissson i sar., 2016). RT-PCR i qRT-PCR su veoma uspešno primenjene u detekciji GFLV virusa u nekoliko istraživanja, a detalji o prajmerima i fluorescentnim probama dati su u tabeli broj 1.

Tabela broj 1. Prajmeri i probe za RT-PCR i qRT-PCR detekciju GFLV

Prajme/ Proba	Sekvenca	Gen	Veličina produkta	Referenca
F	ATGCTGGATATCGTGACCCTGT	RdRP	118	(Gambino i Gribaudo, 2006)
R	GAAGGTATGCCGTGCTTCAGTGG			
F	GGGACCACTATGGATGGAATGA	CP	151	Osman i Rowhani, 2006
R	TTCGGTGATATGGAGAGCGAAT			
P	TAMRA- AAGTATCCCGGGGTGTATGTGGAAGAGGA- FAM			
F	AGCTGCGGCACTYTTTGC	HP	128	Čepin i sar., 2010
P1	FAM-TGCTCAARCATAACCACTTG-MGB			
P2	FAM-ATGCTTAARCATAACCACTTG-MGB			
R	TCATCACTRGTGTCATAACCACTTCCT			
F	GGTWTRTTCGGGCCAYTGT	HP	181	Bruissson i sar., 2017
R	TYATCACTRGYGTCAACCACTTCC			
P	ROX-GGGANGAGTCGAGAGCTGCGGCA-BBQ			

F- forward prajmer, R- reverse prajmer, P- proba, CP- coat protein, HP- homing protein, RdRP – RNK zavisna RNK transkriptaza

Uzimanje i rukovanje uzorcima vinove loze na prisustvo GFLV

Uzimanje uzoraka sa određenih delova biljke u određeno doba godine povećava pouzdanost testiranja. Za detekciju GFLV uzimaju se listovi i mladari, a kasnije u laboratoriji se izdvajaju lisni nervii peteljke, dok se sa mladara uzima tkivo ispod kore (ksilem, floem), jer se u ovim biljnim delovima očekuje najveće prisustvo

virusa. Uzorci se mogu uzimati od kretanja vegetacije pa sve do pojave prvih mrazeva. Za pouzdanost testiranja bitno je i pravilno rukovanje i dostavljanje uzoraka laboratoriji. To podrazumeva pravilno pakovanje i obeležavanje uzoraka. Sakupljeni, zapakovani i šifrirani uzorci bi se trebali dostaviti u laboratoriju u što kraćem vremenskom roku. Ukoliko su uzorci bili izloženi neumerenoj vrućini, sušenju ili su predugo čuvani, mogućnost za dobijanje pouzdanih rezultata se smanjuje. Prilikom uzimanja uzoraka vinove loze, poželjno je testiranje većeg broja uzoraka. Broj uzoraka za testiranje kojima podleže vinova loza definisan je Pravilnikom o zdravstvenom pregledu useva i objekata za proizvodnju semena, rasada i sadnog materijala i zdravstvenom pregledu semena, rasada i sadnog materijala ("Sl. glasnik RS" 2008), koji podrazumeva da se od ukupnog broja čokota, testira 10%.

Pouzdanost laboratorijskih testiranja

Najbolji rezultati u detekciji virusa vinove loze dobijaju se primenom različitih metoda (serološke i molekularne). Do problema pri testiranju i dobijanja lažno negativnih rezultata dolazi usled neadekvatnog uzimanja uzoraka za analizu, nejednake distribucije i koncentracije virusa u biljci. Zbog osetljivosti molekularnih metoda, testiranja sprovoditi na preporučen način da bi se rizik od kontaminacije sveo na najmanju meru. Samo nekoliko virusnih čestica prenesenih iz jednog uzorka na drugi može dovesti do lažnih pozitivnih (Weber i sar., 2020). Kod ELISA testova lažno pozitivni rezultati se dobijaju ukoliko antiserum reaguje na neku biljnu komponentu u aditivu.

ZAKLJUČAK

Virus infektivne degeneracije vinove loze (GFLV) je jedan od ekonomski najvažnijih virusa koji inficira vinovu lozu. Infekcija ovim virusom uzrokuje brz gubitak vitalnosti biljke, smanjen porast vinove loze i prinos grožđa. Virus se prenosi nematodama *Xiphinema index* i *Xiphinema longidorus*. Širenje na veće udaljenosti je uslovljeno zaraženim sadnim materijalom vinove loze. Zbog toga je veoma važno primenjivati sve raspoložive i pouzdane serološke i molekularne metode detekcije na prisustvo GFLV u sadnom materijalu vinove loze. Tehnike detekcije GFLV opisane u ovom radu, omogućavaju efikasnu kontrolu sadnog materijala vinove loze i veću sigurnost u prometu zdravog sadnog materijala.

LITERATURA

- Alemu, K. (2015): Detection of diseases, identification and diversity of viruses. A review. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*; 5: 204–214.
- Almeida, R. P. P., Daane, K. M., Bell, V. A., Blaisdell, G. K., Cooper, M. L., Herrbach, E., & Pietersen, G. (2013): Ecology and management of grapevine leafroll disease. *Frontiers in Microbiology*, 4, 94.
- Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G. et al.. (2004): *Grapevine fanleaf virus*: Still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology* 86 (3), 183-195.
- Aydin, S. (2015): A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72: 4-15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>.
- Bagi, F., Jasnić, S., Budakov, Dragana (2016): Viroze biljaka. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
- Bruisson, S., Lebel, S., Walter, B., Prevotat, L., Seddas, S., Schellenbaum, P. (2016): Comparative detection of a large population of grapevine viruses by TaqMan® RT-qPCR and ELISA. *J Virol Methods*. 240:73-77. doi: 10.1016/j.jviromet.2016.12.003.
- Butler, J.M. (2012): DNA Quantitation. In: Butler JM (2012): *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Academic press. Pages 49-67
- Caetano-Anollés, D. (2013): Polymerase Chain Reaction. In Maloy, S., and Hughes, K. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 392–395. doi:10.1016/b978-0-12-374984-0.01186-4
- Clark, M.F. i Adams, A.N. (1977): Characteristics of the micro-plate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 475-483.
- Cohn, E., Tanne, E., and Nitzany, F. E. (1970): *Xiphinema italiae*, a new vector of *Grapevine fanleaf virus*, *Phytopathology*, 60, 181-182.
- Čepin, U., Gutiérrez-Aguirre, I., Balažić, L., Pompe-Novak, M., Gruden, K., Ravnikar, M. (2010): A one-step reverse transcription real-time PCR assay for the detection and quantitation of *Grapevine fanleaf virus*. *J. Virol. Methods*. 170,47–56, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.08.018>.
- Dalmasso, A., Boubals, D., Bongiovanni, M., Pistre, R. (1972): Distribution of nematode vectors of fanleaf in vineyards of southern France. *Progr. Agric. Vitic.*, 89, 456–462.
- Diklić, K. (2014): Zaraženost sorte Muškat momjanski (*Vitis vinifera* L.) virusima. Diplomski rad Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Engvall, E., Perlmann, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9): 871-874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X).

- EPPO (2008) Pathogen tested material of grapevine varieties and rootstocks. EPPO Bulletin, 38: 422-429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2008.01258.x>
- Erlich, H.A. (1989): Polymerase chain reaction. J Clin Immunol 9, 437–447. <https://doi.org/10.1007/BF00918012>
- Fuchs, M. (2003): Transgenic resistance: state of art and perspectives. 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, 221-222.
- Fuchs, M., Marsella-Herrick, P., Loeb, G.M., Martinson, T.E., Hoch, H.C. (2009): Diversity of ampeloviruses in mealybug and soft scale vectors and in grapevine hosts from leafroll-affected vineyards. Phytopathology, 99, 1177-1184.
- Gambino, G., Gribaudo, I. (2006): Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex RT-PCR with coamplification of a plant RNA as internal control. Phytopathology 96: 1223–1229.
- Gariyban, L., Avashia, N. (2013): Polymerase chain reaction. The Journal of investigative dermatology, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc. Natl Acad Sci U S A, 88(16):7276-80. doi: 10.1073/pnas.88.16.7276.
- Komar, V., Vigne, E., Demangeat, G., Lemaire, O., and Fuchs, M. (2008): Cross-protection as control strategy against *Grapevine fanleaf virus* in naturally infected vineyards. Plant Disease, 92, 1689-1694.
- Lázár, J., Kölber, M., Lehoczy, J. (1990): Detection of some nepoviruses (GFV, GFV-YM, GCMV, ArMV) in the seeds and seedlings of grapevines by ELISA. *Kertgazdaság*, 22, 58-72.
- Maliogka, V.I., Martelli, G.P., Fuchs, M., Katis, N.I. (2015): Control of viruses infecting grapevine. Advances in Virus Research, 91, 175-227.
- Martelli, G. P., Walter, B., Pinck, L. (2001): Grapevine fanleaf virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No 385. Commonw Mycol Inst/ Assoc Appl Biol, Kew, UK.
- Martelli, G.P. (2014): Grapevine-infecting viruses. European Journal of Plant Pathology 96, 7– 8.
- McKenry, M. V., Thomason, I. J. (1974): Dosage values obtained following pre-plant fumigation for perennials. I 1,3-dichloropropene nematicides in eleven field situations. Pestic Sci, 7, 521–534.
- Mekuria G., Ramesh, S.A., Alberts, E., Bertozzi, T., Wirthensohn, M., Collins, G., Sedgley, M. (2003): Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of *Prunus necrotic ring spot virus* and *Prune dwarf virus* in almond (*Prunus dulcis*). Journal of Virological Methods 114 (1), 65- 69.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986): Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 51: 263

- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-50. doi: 10.1016/0076-6879(87)55023-6. PMID: 3431465.
- Nestorov, J., Matić, G., Elaković, I., Tanić, N. (2013): Gene expression studies: how to obtain accurate and reliable data by quantitative real-time rt pcr. *Journal of Medical Biochemistry*, 32(4), 325-338.
- Osman, F., Rowhani, A. (2006): Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *J. Virol. Methods* 133, 130–136.
- Raski, D.J., Goheen, A.C., Lider, L.A., Meredith, C.P. (1983): Strategies against *Grapevine fanleaf virus* and its nematode vector. *Plant Disease* 67 (3), 335-338.
- Rowhani, A., Uyemoto, J. K., Golino, D. A., Martelli, P. G. (2005): Pathogen testing and certification of *Vitis* and *Prunus* species. *Annu. Rev. Phytopathology*; 43: 6.1–6.18.
- Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., Morimoto, S. (2018): Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med.* 72(1):32-42. doi: 10.1007/s11418-017-1144-z.
- Sastry, K.S and Zitter, T. A. (2014): *Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics*, DOI: 10.1007/978-94-007-7820-7_2, _ Springer Science+Business Media B.V.
- Službeni Glasnik Republike Srbije br. 39/2006, 59/2006, 115/2006, 119/2007 i 107/2008: Pravilnik o zdravstvenom pregledu useva i objekata za proizvodnju semena, rasada i sadnog materijala i zdravstvenom pregledu semena, rasada i sadnog materijala.
- Trujillo, A.A, McCaustland, K.A., Zheng, D.P., Hadley, L.A., Vaughn, G., Adams, S.M., Ando, T., Glass, R.I., Monroe, S.S. (2006): Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J Clin Microbiol.* 44(4):1405-12. doi: 10.1128/JCM.44.4.1405-1412.2006.
- Van Weemen, B.K., Schuurs, A.H.W.M. (1971): Immunoassay using antigen—enzyme conjugates. *FEBS Letters*, 15(3) 232-236. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(71\)80319-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(71)80319-8)
- Wages, J.M. (2005): Polymerase Chain Reaction. In: Worsfold, P., Townshend, A., Poole, C. *Encyclopedia of Analytical Science* (Second Edition). Elsevier, 243-250, <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00475-1>.
- Weber E., Golino D., Rowhani A. (2020): Laboratory testing for grapevine diseases.

Abstract

DIAGNOSTICS OF GRAPEVINE FANLEAF VIRUS

Đina Konstantin, Goran Barač, Renata Iličić, Ferenc Bagi

University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Novi Sad

E-mail: djinakonstantin@gmail.com

Plant viruses cause considerable economic losses and are a threat for sustainable agriculture. Due to the multiple possibilities of infection, they have become widespread. The use of healthy propagation material, free of viroids, viruses and bacteria, is an important strategy in disease control in viticulture. The early and accurate detection of plant viruses is an essential component of their control. Due to the widespread of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) and its devastating potential, various diagnostic methods are being used. GFLV detection methods based on the specificity of the protein cover (ELISA) and nucleic acid-based virus detection methods (RT-PCR, qRT-PCR). Symptoms of viral diseases are often not distinct and can be confused with those of abiotic stresses, so visual inspection is not reliable enough.

Keywords: GFLV, propagation material, detection methods, serological and molecular techniques